

## 21. インフルエンザウイルス研究センター

センター長 小田切 孝人

### 概要

当センターは、インフルエンザに関する研究・開発業務及び国の新型インフルエンザ事前準備と緊急対応体制の強化、WHO インフルエンザ協力センターとして海外情報の収集機能の強化、東アジア地域を包括したサーベイランス網の活性化と技術支援および WHO 世界インフルエンザ監視対応機構の運営への参画、及びワクチン製剤の品質管理体制の維持と改善などをめざして、平成 21 年 4 月 1 日に 6 室体制で村山庁舎に新設された。業務はインフルエンザの病原・病因・予防・診断・治療法等に関する研究、レファレンス業務、細胞培養ワクチン及び経鼻接種方法の開発、ワクチン製剤の品質管理及び国際協力である。第 1 室(ウイルスサーベイランス)、第 2 室(診断検査、国内外研修)、第 3 室(ワクチン製剤品質管理、GMP 管理)、第 4 室(季節性・新型ワクチン製造株の開発)、第 5 室(細胞培養ワクチン開発)、第 6 室(経鼻接種ワクチン開発)が業務を分担・協力しながら実施している。

人事異動では、平成 27 年 4 月 1 日付けで桑原朋子が任期付研究員に採用された。また、相内章主任研究官が感染病理部に配置換となった。平成 27 年 4 月 13 日付で岸田典子主任研究官が育児休業より職務復帰した。

研究開発業務としては、インフルエンザワクチン株に採用できる発育鶏卵分離株の確保および鶏卵馴化による抗原変異を克服するウイルスの検索に関する研究、インフルエンザ以外の呼吸器系ウイルスの同定検査系の新規構築、単クローン抗体を用いた H7 亜型鳥インフルエンザウイルス検出用迅速診断キットの開発、新型ウイルス発生時にヒト型レセプター親和性の程度を簡便に評価できる測定系の構築を行った。

流行動向調査(サーベイランス)およびレファレンス業務では、地衛研、感染症疫学センターと連携して、国内および周辺諸国から流行株を収集し、それらの抗原性・遺伝子解析、薬剤感受性試験などを実施し、解析結果を感染症疫学センターHPを通じて週ごとに情報還元

した。これらの解析情報をもとに次シーズン向けのワクチン候補株の検索を行い、WHO ワクチン推奨株など海外情報も考慮して平成 27 年度のワクチン株の選定を行った。また、改正感染症の施行に先駆けて、第 3 回目の PCR 検査の外部精度管理を全国地衛研に実施し、検査精度の向上と改善への助言を行った。これは H28 年度から国の事業として継続的に実施される各病原体の外部精度管理事業の基盤となり、国の流行予測事業への直接的な貢献となった。さらに、ウイルスサーベイランスに必須な全国地衛研におけるウイルス分離技術の改善への指導、助言を開始し、ウイルス分離技術の外部精度管理試験の事業化へ向けた取り組みに着手した。

インフルエンザワクチンに関する研究業務としては、細胞培養法による季節性インフルエンザワクチンの実用化に向けて、ワクチンシードウイルス分離用の品質管理された MDCK 細胞(NIID-MDCK)の新規開発、その製造株の供給と適性を評価する体制整備(製造用シードウイルスの作製法、高増殖性母体ウイルスの開発、安定供給戦略の企画、迷入ウイルス検出などシードウイルスの品質確保のための試験系の確立)を国内ワクチンメーカー、厚労省と共同で進めた。さらに、細胞培養ワクチン候補株の国際的認定の枠組みを海外 WHO インフルエンザ協力センターと共同で策定した。さらに、平成 27 年度から導入される 4 価ワクチンの力価を正確に測定するための手法見直しと評価法の策定を行った。また、新型インフルエンザ対策として国家備蓄されている H5N1 プレパンドミックワクチンの株選定および今後の備蓄戦略の再検討のために、備蓄 H5N1 ワクチンで誘導されるヒト血清抗体の交差反応性の評価成績を厚生科学審議会へ提供した。

国際協力では、新たな WHO パンデミックインフルエンザ基本構想(PIP-Framework)に基づく世界インフルエンザ監視対応体制(GISRS)の基幹である WHO インフルエンザ協力センターとして、周辺諸国と連携したサー

ベイルランス活動及びパンデミック緊急対応計画の再検討・改善・強化への助言・提言とその実施を担った。世界各国の分離株・臨床検体の解析、流行予測及び候補ワクチンの効果予測から、南北半球向けの WHO ワクチン推奨株をそれぞれ選定した。WHO 世界インフルエンザ行動計画に主要メンバーとして参画し、PCR 診断、薬剤耐性の各作業班会議、世界インフルエンザ研究計画の推進、ワクチン株選定法の改良、ワクチン品質管理、などで重要な役割を果たした。また WHO、JICA 等の依頼に応じて、海外インフルエンザセンター（ベトナム、モンゴルなど）への技術指導、研修を行った。WHO H5N1 指定研究室として、世界各地の高病原性 H5N1 の診断、分離、性状解析、技術支援を実施した。また、WHO 重要品質管理規制研究室として、ワクチン製造候補株の開発及び参照品の作製、国際標準化、分与及び周辺諸国への技術研修と精度管理試験等を実施した。

インフルエンザウイルス研究センターが発足してから 6 年が経過し、研究業務およびセンター通常業務を円滑に推進し、センター機能を強化するため、適正な人材の確保、現有若手研究者の育成法の見直しなども重点課題となっている。

## 業績

### 調査・研究

#### I. インフルエンザウイルスに関する研究

##### 1. 北海道内で地域流行を起こした抗インフルエンザ薬耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの性状解析

2013 年 11 月から 2014 年 2 月にかけて札幌市を中心とした北海道内で地域流行を起こしたオセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの性状解析を行った。その結果、すべての耐性ウイルスは NA 蛋白質に、H275Y 耐性変異に加えて V241I および N369K 変異をもち、感受性ウイルスと同等の増殖・伝播能をもつことが示された。一方で N386K 変異によって耐性ウイルスの NA 蛋白質の安定性が低下しており、感受性ウイルスの感染拡大に伴って耐性ウイルスの流行が終息したと推測された。[高下恵美、木曾真紀\*、藤崎誠一郎、横山 勝\*\*、中村一哉、白倉雅之、佐藤裕徳\*\*、菅原裕美、佐藤彩、小田切孝人、河岡義裕\*、田代真人：\*東京大学医科学研究所、\*\*病原体ゲノム解析センター]

##### 2. インドで大流行を起こした A(H1N1)pdm09 ウイルスの性状解析

2014 年 12 月からインドで大流行を起こした A(H1N1)pdm09 ウイルスの性状を知るために、インド滞在中に感染し日本帰国後に発症した患者から分離された A(H1N1)pdm09 ウイルスについて性状解析を行った。その結果、インド由来株は HA 蛋白質および NA 蛋白質に特徴的な変異をもつことが明らかになったが、病原性に関わる変異は認められなかった。また、抗原性はワクチン株と類似しており、抗インフルエンザ薬に対しても感受性を保持していた。[高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、大宮 卓\*、佐藤 光\*、伊藤洋子\*、千葉ふみ子\*、西村秀一\*、進藤静生\*\*、菅原裕美、佐藤 彩、小川理恵、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人：\*仙台医療センター、\*\*しんどう小児科]

##### 3. A/Saitama/103/2014 (H3N2)インフルエンザウイルスの性状解析

近年、H3N2 ウイルスを鶏卵で分離すると、HA の抗原部位に変異が入るため抗原性が変化し、流行株とワクチン株の抗原性が乖離する現象が起きている。これは、ワクチン株を選定する際の大きな問題となっている。本研究では、ワクチン候補株として分離した A/Saitama/103/2014 (H3N2)株（埼玉株）に着目した。このウイルスは、鶏卵で 8 代（羊膜腔で 4 代、漿尿膜腔で 4 代）継代したところ、細胞分離の埼玉株と比較して、NA に 10ヶ所の変異を持っていた。一方で、HA には抗原部位ではない場所の 1ヶ所にしか変異を持っていなかった。このウイルスのフェレット抗血清を作製し、流行株との反応性を調べたところ、現行のワクチン株よりも流行株と高い反応性を示した。これは、鶏卵分離埼玉株では、HA の抗原部位に変異が入らなかったためと考えられる。今後、リバーシジェネティクス法で組換えウイルスを作製し、鶏卵分離埼玉株の NA の変異に関して、その意義について検証する。[桑原朋子、中村一哉、岸田典子、白倉雅之、藤崎誠一郎、高下恵美、高橋 仁、秋元未来、小川理恵、佐藤 彩、三浦秀佳、菅原裕美、信澤枝里、渡邊真治、小田切孝人]

#### 4. 動物由来インフルエンザウイルスのレセプター結合特異性に関する研究

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。さらに、2013年に発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは、季節に応じて発生と消失を繰り返している。このような背景から、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施し、ヒトへの感染リスク評価を実施することは、重要な意義を持つと考えられる。本研究では、動物由来インフルエンザウイルスのリスク評価のため、合成シアロ糖鎖ポリマーを用いたレセプター結合特異性実験を試みた。その結果、ウイルスのレセプター特異性を簡便に判定することが可能となった。今後、ウイルスの遺伝子解析、抗原性解析に加え、レセプター結合特異性を含めた継続的な動物由来インフルエンザウイルスのサーベイランスを実施することが重要であると考えられる。[白倉雅之、鈴木康夫\*、小田切孝人、渡邊真治：\*中部大学]

#### 5. インフルエンザウイルス核酸診断検査法の地方衛生研究所に対する外部精度管理の実施

全国 73ヶ所の地方衛生研究所に対して、インフルエンザウイルス核酸診断検査法(リアルタイム RT-PCR 法)についての第 3 回全国地衛研外部精度管理(EQA)を実施した。各地方衛生研究所から送付された結果報告およびアンケートに対して詳細な解析を行い、EQA の結果については各所に報告した。また、EQA を実施した結果、各所が行うインフルエンザウイルス核酸診断検査法に何らかの問題点が見つかった場合はトラブルシューティングを個別に行い、検査精度向上に向けた改善方法などを助言した。[影山 努、中内美名、高山郁代、高橋 仁、小田切孝人]

#### 6. 呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系の構築

核酸増幅法として知られている RT-LAMP 法を用いて、インフルエンザウイルスを除く呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系を構築し、感染症診断に応用することを目的とした研究を行っている。本年度は検出候補としてライノウイルス A 型を選択し、RT-LAMP 法による検出系の構築を行った。その結果、今回構築を行った RT-LAMP

法を用いたライノウイルス A 型検出系は、高感度にウイルス遺伝子を検出できることが確認された。以上の結果から、設計したプライマーセットは呼吸器感染症ウイルス群の核酸検出系として有用であることが示唆された。[高橋 仁、高山郁代、中内美名、永田志保、改田 厚\*、久保英幸\*、小田切孝人、影山 努：\*大阪市立環境科学研究所]

#### 7. H7 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H7N9 インフルエンザ迅速診断系構築の検討

今後、パンデミックを引き起こす可能性のある A(H7N9)インフルエンザの高感度・特異的な迅速診断系を構築することを目的とした研究を行っている。A(H7N9)ウイルスの HA アミノ酸配列の比較を行い、H7 HA 特異的で保存性の高い領域を選び出し、そこから合成したペプチドをマウスに免疫し、モノクローナル抗体の作製を行い、得られたモノクローナル抗体クローンは H7 HA 蛋白質を認識し、H1pdm、H3 および H5 HA 蛋白質には反応しないことを確認している。この中から反応性の高い抗体クローンを選択し、そのハイブリドーマ細胞を用いてマウス腹水作製および抗体精製を行い、精製抗体を標識して、サンドイッチ ELISA 系の構築を試みたところ、H1pdm、H3 および H5 HA 蛋白質には反応せず、H7 HA 蛋白質を特異的に検出可能な抗体の組み合わせを得ることができた。この抗体を用いた迅速診断キットの構築を進めている。[高橋 仁、中内美名、永田志保、小田切孝人、影山 努]

#### 8. Direct RT-LAMP 法を用いた A 型インフルエンザウイルス亜型同定および B 型インフルエンザウイルス系統識別キットの構築

これまで分離したインフルエンザウイルスの型・亜型・系統の同定には HI 法が用いられてきた。HI 法は安価ではあるが、抗血清が必要で手技が煩雑で判定までに時間がかかる。一方 Direct RT-LAMP 法は、ウイルス分離上清を抽出試薬で希釈した液を、乾燥化した試薬に混合し 30 分間等温反応を行うことで、型・亜型・系統を同定することが可能である。これまで当室で構築してきた検出系を 8 連チューブに固相化し、インフルエンザウイルスの型・亜型・系統の同定の迅速化についての検討を行

った。[高山郁代、中内美名、影山 努]

#### 9. Antigen-capture ELISA を用いたインフルエンザウイルスエアロゾルを安全に測定する新規方法

新型インフルエンザ等の輸入・新興感染症患者を治療する際やその臨床検体を検査する際、医療従事者にとって防護具は不可欠であり、防護具の病原体に対する防護性能を評価しておくことは必要である。我が国では、日本工業規格(JIS)に防護具やその素材の病原体に対する防護性能評価試験がいくつか制定されているが、暴露形態の1つであるエアロゾル感染を想定したウイルスエアロゾルによる評価試験法が無い。この評価試験法開発の基盤として、昨年度、インフルエンザウイルスの粒子エアロゾルを定量するための、ペプチド抗体によるM1蛋白を標的とした antigen-capture ELISA を構築した。本 ELSIA 系では、試験ウイルス PR8 株の粒子量に対する容量反応性の直線性や定量再現性は良好であった。

本年度は、ウイルスエアロゾル試験を安全に実施するための方法として、生ウイルスによる試験者の感染を避けるため不活化ウイルスを用いた試験方法を公案し、適用可能性について検証した。まず、β-プロピオラクトン処理を行った不活化ウイルス PR8 液について、動的光散乱計(DLS)と透過電子顕微鏡(TEM)で粒子状態を性状解析したところ、intact な単粒子分散状態を保持していることが観察された。次に、エアロゾル実験中の実験者又は環境由来の混入汚染を想定して、*B.subtilis*、*S.epidermidis*、Adenovirus 3 を混在させ、本 ELSIA の PR8 測定に影響のないことを確認した。また、本 ELSIA による M1 蛋白量は PR8 ウイルスの感染価(不活化前)と相関性があることも確認した。更に、この方法を用いて、PPE の不織布素材 2 サンプル(Spunlace、SMS)の不活化 PR8 エアロゾルに対する防護性能を評価したところ、素材間の有意差が認められ、性能評価におけるこの新規方法の適用可能性が示唆された。[嶋崎典子、野島康弘\*、岡上晃\*、篠原克明\*\*：\*(一財)北里環境科学センター、\*\*バイオセーフティ管理室]

#### 10. 中国で発生したインフルエンザ H7N9 株の動物における感染性の検討

2013 年より中国で発生した新規インフルエンザ H7N9

株の動物における感染性および病原性を検討しており、前年度までに A/Anhui/1/2013 (Anhui 株：H7N9) 株がマウスにおいて高い致死性を有していること、高病原性トリインフルエンザ (HPAI) に認められるような全身的な感染は認めないことを示した。またマウス馴化株 (Anhui-M3) は原株 (Anhui-E) よりおよそ 500 倍もの非常に高い致死性を有し、上気道に限局した局所感染においても上気道から速やかに肺へ感染が移行することも明らかとなった。このような増殖性の変化には、PA 分子に変異が関与していることが示唆されたが、生体側の要因が検討されていないため、今年度は引き続き、マウス馴化株 (Anhui-M3) の感染後の生体防御機構、特に自然免疫因子である Type I IFN 関連遺伝子群について原株 (Anhui-E) の感染時と比較検討を行った。

BALB/c マウス (6-8 週齢、メス) に  $10 \times LD_{50}$  量、もしくは  $0.1 \times LD_{50}$  量の Anhui-E もしくは Anhui-M3 を感染させ ( $50 \mu\text{L}$ , i.n.) 1 日もしくは 3 日目に肺を採取し、乳剤を作製し、全 RNA を抽出後、Type I IFN 関連遺伝子群の解析を行った。その結果、CCL2、CXCL10、IFIT2、MX1 において共通かつ顕著な動態の違いが認められた。 $0.1 \times LD_{50}$  量では Anhui-E 感染群、Anhui-M3 感染群ともに、感染 1 日目は非感染群と同等の発現で、感染 3 日目には顕著な発現の増加が認められた。しかし  $10 \times LD_{50}$  量を感染させた 1 日目において、Anhui-M3 感染群は Anhui-E 感染群よりも有意に低い発現しか認められなかった。このことは馴化によって高い増殖性を獲得しただけでなく、生体の自然免疫群から逃避していることも示唆された。[浅沼秀樹、小田切孝人、相内 章\*：\*感染病理部]

#### 11. インフルエンザウイルスの適切な不活化工程の策定に関する研究

インフルエンザウイルスは病原性が多様であるため、その性状によって適切なバイオセーフティレベル (BSL) を遵守して使用する必要がある。また様々な性状を有するために、ウイルスを不活化する場合には科学的根拠に基づいた適切な不活化手技が必要となる。そのため特に BSL3 インフルエンザウイルスの適切な不活法の構築とそのバリデーションならびに文書整備を行っている。今年度は現在実験に用いるインフルエンザウイルスの不活化に主に使用されている β-プロピオラクトン (BPL)

の適切な使用に関するバリデーションの一環として、環境要因、特に温度変化による BPL の活性の変化について検討した。新規購入した BPL を 100 $\mu$ L ずつ分注後、-30 $^{\circ}$ C で保管し、37 $^{\circ}$ C、1 時間もしくは 5 時間保温を 1 日、3 日もしくは 5 日連続で処理し、それぞれの BPL を 0.1% の濃度となるよう A/Narita (A(H1N1)pdm09) 株と混合し、9 日間作用させ、培養細胞を用い不活化活性を確認した。その結果、全ての BPL で不活化が認められた。このことから最も温度変化が顕著であった条件である 5 日連続で 37 $^{\circ}$ C、5 時間の環境においても、BPL の高い不活化能を確認できた。[浅沼秀樹、小田切孝人]

## II. インフルエンザワクチンに関する研究

### 1. インフルエンザワクチンの血清学的評価に関する研究

ワクチン接種者血清の抗体保有率、陽転率、および流行株との交差反応性を調べることは、インフルエンザワクチンの有効性やワクチン株の変更の必要性を検討するうえで重要である。そこで、2015/16 シーズンの季節性インフルエンザワクチン接種をうけた成人層および老人層の各群 30 名のペア血清検体を用いて、ワクチン製造株および流行株に対する反応性を赤血球凝集抑制試験にて評価した。その結果、B 型ワクチンについては山形系統、ビクトリア系統ともに抗体保有率と陽転率で低い値を示したが、A(H1N1)pdm09 および A(H3N2)ワクチン製造株に対しては、高い抗体保有率を示した。A(H3N2)では陽転率においても高い値を示した。しかしながら、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 山形系統および B ビクトリア系統のいずれにおいても流行株との交差反応性は低く、2015/16 シーズンワクチンの効果の減弱が懸念された。アメリカ、イギリスから入手したヒト血清についても同様の評価を行った。その成績を WHO インフルエンザ協力センター間で共有し、9 月と 2 月に開催された WHO インフルエンザワクチン推奨株選定会議で議論され、ワクチン株選定の資料として活用された。[岸田典子、中村一哉、桑原朋子、佐藤 彩、秋元未来、菅原裕美、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、三浦秀佳、小川理恵、菖蒲川由郷\*、齋藤玲子\*、渡邊真治、小田切孝人：\*新潟大学国際感染医学講座]

### 2. フェレットを用いた H3 インフルエンザワクチン効果の評価に関する研究

季節性インフルエンザワクチン接種者の血清学的調査で、ワクチン接種により誘導された抗体と実際の流行株との反応性が低く、ワクチン効果の減弱が懸念されている。ワクチン製造株が発育鶏卵で培養される過程で起こる HA のアミノ酸置換が、ワクチン製造株と流行株との抗原性の乖離をまねき、ワクチンで誘導される抗体と流行株の反応性を低下させると考えられる。そこで、フェレットを用いて、市販の 2012/13 シーズンの 3 価のスプリットワクチンと、スプリットワクチンに比べて高い免疫原性と交差反応性が期待される不活化全粒子ワクチンの効果を比較評価した。不活化全粒子ワクチンについては、スプリットと同じ抗原を含む 3 価のワクチンを作製し、使用した。2012/13 シーズンのスプリットワクチンまたは不活化全粒子ワクチン接種により抗体価の上昇が認められたフェレットに 2012/13 シーズンの H3 ワクチン製造株 IVR-165 を感染させると、いずれも非免疫群に比べてウイルス排泄期間が短縮された。しかしながら、MDCK 細胞で分離された 2012/13 シーズンワクチンのオリジナル株 A/Victoria/361/2011 を感染させると、不活化全粒子ワクチンを免疫したフェレットでは、ウイルス排泄期間が短縮されたが、スプリットワクチンではウイルス排泄期間は短縮されなかった。不活化全粒子ワクチンで免疫したフェレットでは、さらに抗原性の乖離した 2015 年の H3 流行株を感染させた場合にも、ウイルス排泄期間の短縮が認められた。以上から、スプリットワクチンでは、抗原性の乖離がワクチン効果の減弱に大きく影響するが、不活化全粒子ワクチンは抗原性が乖離したウイルスに対しても効果が期待できることがわかった。[岸田典子、中村一哉、桑原朋子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、渡邊真治、小田切孝人]

### 3. 4 価インフルエンザワクチンの導入における一元放射免疫拡散試験法の評価の研究

平成 27 年度から、B 型 2 系統(ビクトリア系統と山形系統)を含有する 4 価ワクチンが我が国にも導入されるにあたり、ワクチンの有効成分である HA 抗原量が、従来通り一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法によって、正確

に測定できるか評価してきた。これまでの検討において、B 型 2 系統は、ウイルス株、標準抗原及び参照抗血清などの SRD 試薬やワクチンの由来によって交差反応の挙動が異なるため、4 価ワクチンの SRD 試験で B 型株 HA 抗原量を適正に測定するには、各製造所のワクチンに対する抗血清や標準抗原の特性を事前検討して使用方法

(試験方法の区分)を決める必要があることがわかっている。そこで、本年度の 4 価ワクチンの B 型ワクチン株 B/Phuket/3073/2013、B/Texas/2/2013 について、国内製造所 4 所社と共同で、試験区分を制定するための試験を実施した。そのために必要な、区分判定の閾値設定も行った。その結果、Phuket 株は区分 1 (標準抗原を単独で従来法によって試験を実施する)、Texas 株は区分 2 (2 系統の B 型ウイルス標準抗原を等量混合して試験を実施する)で SRD 試験を実施することが妥当であると結論づけられた。[嶋崎典子、原田勇一、落合雅樹\*、小田切孝人、板村繁之：\*品質保証・管理部]

#### 4. ワクチン力価(HA 抗原量)の新規試験法の開発に関する研究

B 型 2 系統を含有する 4 価ワクチンは、現行の SRD 試験法では、B 型ウイルス 2 株間に交差反応が起こり、正確な HA 抗原量測定が困難な場合がある。そこで交差反応がないモノクローナル抗体による ELISA 等新規法の開発を検討した。まず、マウスハイブリドーマとして、山形系統の B/Massachusetts/02/2012(BX-51B)株の HA 特異的モノクローナル抗体を産生する 2 クローンと、ピクトリア系統の B/Brisbane/60/2008 の HA 特異的モノクローナル抗体を産生する 6 クローンを樹立した。これらのモノクローナル抗体について、複数のワクチン株との ELISA 反応性や、ウェスタンブロット反応性、中和能などの性状解析を行った。次に、いくつかのモノクローナル抗体を選択して、antigen-capture sandwich ELISA を構築した。以前の検討で SRD 試験では測定不能(2 株混合では沈降輪形成不良が生じた)となった

B/Wisconsin/01/2010(BX-41A)と B/Brisbane/60/2008 株の混合ワクチンについて、本 ELISA 系で測定したところ、両株とも問題なく HA 抗原量が測定可能であり、交差反応も認められなかった。また、本年度の B 型ワクチン株 B/Phuket/3073/2013、B/Texas/2/2013 のワクチンに対して

も、系統特異的に測定可能であることがわかった。現在、SRD 試験との相関性について検討中である。[嶋崎典子、板村繁之]

#### 5. ワクチンの免疫原性に関与する免疫応答測定方法の開発に関する研究

ワクチンによる免疫応答は、投与されたワクチンを抗原提示細胞が取り込むことから開始するとされている。本年度は昨年度に引き続き、抗原提示細胞のワクチン取り込みの評価をすることでワクチンの免疫原性を評価できるかについて、ヒトマクロファージ細胞株における NF- $\kappa$ B の活性化または ISG の活性化を指標に検討した。インフルエンザ全粒子ワクチンは用量に依存して定量的にマクロファージの活性化を誘導し、この活性は SRD 試験による力価とマウスにおける抗体産生、感染防御能と同様に用量依存性を示した。次に熱処理したワクチンについてマクロファージ活性化のレベルを調べた結果、未処理ワクチンに比べて 50°C、18 時間熱処理ワクチンの活性化能は有意に低下し、100°C、5 分熱処理ワクチンでは活性化能は検出されなかった。SRD 試験での力価も同様であったが、SDS-PAGE の泳動像には大きな変化はなかった。マウスに対する防御効果の誘導では、50°C、18 時間熱処理ワクチン接種群では未処理ワクチン接種群に比べて顕著な低下が認められた。100°C、5 分間の熱処理ワクチンには防御効果の誘導はほとんど認められなかった。抗体価についても同様の傾向であった。これらの結果から、マクロファージ活性化を指標とする試験法がインフルエンザ全粒子ワクチンの免疫原性の評価に有用であることが判った。[佐藤佳代子、浅沼秀樹、板村繁之、小田切孝人]

#### 6. 細胞培養ワクチン株作製用母体ウイルスベクターの開発とその応用

現在、日本では季節性インフルエンザワクチン製造に細胞培養法を導入することが検討されている。しかし、実用化に適した細胞培養ワクチン製造用母体ウイルスの開発は遅れている。そこで昨年度は、既存の A/PR/8/34 株(元株)を NIID-MDCK 細胞(無血清培地に馴化し、品質管理された MDCK 細胞)で連続継代することで、高ウイルス力価(約 10<sup>9</sup> pfu/mL)を示す PR8 株(hg-PR8)を

作出した。さらに Hg-PR8 を母体ウイルスとして、HA, NA 遺伝子が、A/Anhui/1/2013(H7N9)に由来するリアソータントウイルス(NIIDRG-10.1C, NIIDRG-10C)を作出し、hg-PR8 株のワクチン株開発における有用性も検討した。本年度は、その有用性の検討を引き続き行った。そのため、両ウイルスを NIID-MDCK 細胞で連続継代し、継代後に抗原解析を行った。その結果、NIIDRG-10.1C と NIIDRG-10C は NIID-MDCK 細胞で 10 連続継代を行っても親株である A/Anhui/1/2013 と同等の抗原性を示し、母体ウイルスとしての有用性が確認された。

また、hg-PR8 株が高増殖性となった要因の探索を行った。そのため、元株である PR8 株に hg-PR8 が獲得したアミノ酸変異を導入したウイルスを作製し、ウイルス力価を測定した。その結果、PB2 の遺伝子に変異を持つウイルスの力価が元株よりも有意に増加していることが確認された。しかし、PB2 だけの変異をもつリアソータントのウイルス力価は、hg-PR8 のそれより低かったことから、他の変異も増殖性に関与している可能性が考えられる。[鈴木康司、小田切孝人、信澤枝里]

#### 7. 季節性細胞培養インフルエンザワクチンの実用化に向けての取り組み

日本の季節性インフルエンザワクチン製造に細胞培養法を導入するために、昨年度に引き続き下記課題への取り組みを行っている。[(1)細胞培養ワクチン株作製法の確立. (2) 細胞培養ワクチンの HA 抗原量測定試薬(SRD 試薬)作製法の確立. (3) 細胞培養ワクチン製造株の指定法の確立.] 課題(1): 感染研所有の NIID-MDCK 細胞を用いて臨床検体から分離したウイルスをワクチン製造所へ分与し、各ワクチン製造所社により、各所社保有細胞での第一回ワクチン製造種株候補の開発およびその評価を行った(詳細は別記)。課題(2):課題(1)で開発されたワクチン株から作製した SRD 試薬を用いて SRD 試験が行えることが確認された(詳細は別記)。課題(3): 第二回「新規インフルエンザワクチンの製造株指定法に関するワーキンググループ会議」を開催し、検討が行われた。本取り組みに関しては、第 10 回、第 11 回厚生科学審議会(予防接種・ワクチン分科会 研究開発及び生産流通部会)で、報告しており、引き続き、進捗状況の報告は本審議会で報告する予定である。[信澤枝里、小田切孝人]

#### 8. 細胞培養ワクチン株作製のための NIID-MDCK 細胞からのウイルス分離条件の最適化の検討

NIID-MDCK 細胞を用いて臨床検体からウイルス(元株)の分離を効率良く行うために、臨床検体中のウイルスゲノム量とウイルス分離効率の相関関係について検討を行った。ウイルスゲノム量は Real-time RT-PCR 法により測定した。A(H1N1)pdm09 および A(H3N2)亜型ウイルスのウイルス分離が可能なウイルスゲノム量を推定した結果、Ct 値が 25 以下の検体からは、ウイルス分離が可能である事が示唆された。一方、B 型ウイルスの分離効率は、検体中のウイルスゲノム量に、大きく影響される事はなく、検討した全ての検体からウイルスが分離された。このことから、A 型ウイルスについては事前に検体中のウイルスゲノム量を測定し、ウイルス分離を行う事とした。[原田勇一、高橋 仁、浜本いつき、小田切孝人、信澤枝里]

#### 9. 細胞培養ワクチン株(種株)の開発 I

2011/2012 および 2012/2013 インフルエンザシーズン用種株の試験的作製を行うために、2010 年から 2012 年に採取された臨床検体を用いて NIID-MDCK 細胞による A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B/Vic, B/Yam ウイルス(元株)の分離を行った。得られた元株は当該シーズンを代表するウイルス株の抗原性と同等であることが確認された。研究協力者である各ワクチン製造所は、この元株を各社が所有する細胞で馴化・増殖させ、種株候補を作製した。製造所社により検討株が必ずしも一致しなかったが、5 社で 20 株が検討された。このうち現時点で評価が終わり当該シーズンを代表するプロトタイプ株と同等の抗原性を示したのは、9 株であった。各所社により進捗状況等が異なるため、現時点で結論は出せないものの、各所社の細胞で種株候補の作製は可能であると判断された。引き続き検討を続け、実用化に向けての問題点を明らかにしていくことが必要である。[原田勇一、高橋 仁、浜本いつき、小田切孝人、信澤枝里]

#### 10. 細胞培養ワクチン株(種株)の開発 II

2016/2017 インフルエンザシーズン用種株の試験的作製を行うために、2015 年から 2016 年に採取された臨床

検体を用いて NIID-MDCK 細胞による A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B/Vic, B/Yam ウイルス(元株)の分離を行った。得られた元株は当該シーズンを代表するウイルス株の抗原性と同等であることが確認された。研究協力者である各ワクチン製造所は、この元株を各社が所有する細胞で馴化・増殖させ、種株候補を作製した。今後、これら候補ウイルスの抗原性等の評価を行う。[高橋 仁、浜本いつき、小田切孝人、信澤枝里]

#### 11. 細胞培養ワクチンの品質評価法の開発

NIID-MDCK 細胞分離株に由来する A(H1N1)pdm09 亜型の種株を用いて HA 抗原量測定試薬 (SRD 試験用の標準抗原および参照抗血清) および細胞培養ワクチンの作製を行った。参照抗血清作製の際、ヒツジへの免疫に用いる不活化 HA 抗原の量、アジュバントの種類、免疫間隔に関して条件検討を行い、ヒツジ抗血清を作製した。これらの抗血清を用いて、標準抗原の値付けを行った結果、試験によるリング形成の明瞭差は多少あったものの、作製した血清から推定される標準抗原量に大きな差は認められず、全て SRD 試験に使用可能であることが確認された。今後、細胞培養ワクチン中の HA 抗原量の測定を行う。[高橋 仁、藤本貴男\*、堀越史朗\*、落合 晋\*、五味康行\*、浜本いつき、小田切孝人、信澤枝里：\*阪大微生物病研究会]

#### 12. 迷入ウイルス検出系の確立に関する研究

ヒトに感染性や病原性を示す 26 種類の病原体を対象とした迷入ウイルス検出系を構築した。各ウイルス株からウイルス核酸を抽出し、RT-PCR 法にて標的遺伝子領域を増幅させて精製後、RNA を合成した。得られた RNA の吸光度から濃度を求め、標準 RNA の分子量からコピー数を算出し、定量 RT-PCR 法の陽性コントロール核酸を作成した。マルチプレックスリアルタイム RT-PCR 法にて陽性コントロール核酸の検出限界値を調べた結果、検出系に 1~100 コピー以上のウイルスが存在していれば、ウイルスの検出が可能であることが示された。また、市販の呼吸器感染症病原体検出キットと比較した結果、概ね今回構築した検出系の方が、検出感度が高いことが示された。構築した検出系を用いて NIID-MDCK 細胞分離株中の迷入ウイルスの検出を試みた。その結果、検討

した全てのウイルスは検出限界値以下であった。[浜本いつき、高橋 仁、小田切孝人、信澤枝里]

#### 13. H5N1 ワクチン株の総ウイルスタンパク収量・HA 収量の改善法の検討

H5N1 ワクチン候補株 20 株について、鶏卵培養後に各株の総ウイルスタンパク収量/HA 収量を測定したところ、株により収量に大きな違いがあることが明らかになった。このうち、クレード 2.2 に属する 2 株は、HA および NA のアミノ酸配列に大きな違いはない(HA に 2 アミノ酸、NA に 1 アミノ酸の違いがある)が、その HA 収量は大きく異なっていた。そこで、その違いの原因を明らかにするため、各ウイルスの HA、NA 遺伝子とそれ以外の遺伝子は、同じ PR8 株に由来するリアソータントウイルスを作出し、HA 収量を測定した結果、HA 収量の有意差は解消した。この結果から HA 収量への母体ウイルスの影響が大きい場合があることが示唆された。[有田知子、鈴木康司、小田切孝人、信澤枝里]

#### 14. 細胞培養インフルエンザワクチン種株選定のための評価基準構築に関する研究

本研究は細胞培養法を用いてインフルエンザワクチンを製造する場合の種株の選定基準を構築することを目的としている。昨年度までに臨床検体から分離・継代した A(H3N2)株の中から、リファランス株と類似の 6 株に対するフェレット感染抗血清ならびに不活化抗原を用いたフェレット抗血清を作製し、臨床分離株に対する HI 試験による抗原認識パターンを検討した結果、感染抗血清と免疫抗血清のパターンが類似していた。引き続き ELISA を用いた抗原認識についても検討した。その結果、HI 試験と同様、感染抗血清と免疫抗血清のパターンの一致が認められた。このことは HI と ELISA どちらの反応系を用いても同様にウイルスの感染免疫による抗体誘導のパターンからワクチンを作製した場合の免疫原性を予測できることを示唆している。[浅沼秀樹、佐藤佳代子、岸田典子、小田切孝人、相内 章\*、許斐奈美\*\*、湯浅徳行\*\*\*、山口陽子\*\*\*\*：\*感染病理部、\*\*日本大学・医、\*\*\*東京化成工業、\*\*\*\*東海大学]

#### 15. ウイルス様粒子 (VLP) を用いた新規経鼻インフルエンザワクチン開発に関する研究



現行のインフルエンザワクチンは主に以下の問題を抱えている。

- ・製造過程でのワクチン抗原の変異
- ・鶏卵の使用による製造量の制約と迷入因子の混入
- ・流行株変異による有効性の低下
- ・ウイルス侵入門戸の分泌型 IgA 誘導不能

このような問題点を解消するためにウイルス様粒子型 (VLP) 経鼻インフルエンザワクチンの開発を行っている。A/California/7/2009(A(H1N1)pdm09)株の HA 遺伝子を用いた VLP (Cal7 HA-VLP) を経粘膜アジュバントの CpG-ODN G9.1 (G9.1) とともにマウスに経鼻投与した場合の免疫応答ならびに防御効果を検討した。その結果、Cal7 HA-VLP を G9.1 とともに経鼻 2 回投与し、Cal7 をチャレンジした場合、完全な感染阻止が認められた。また G9.1 を添加せずに Cal7 HA-VLP のみを経鼻 2 回投与した群においても現行のスプリットワクチン (X-179A) のみを経鼻 2 回投与した群よりも高い防御効果が認められた。また鼻腔洗浄液中には防御効果と関連した特異的 IgA 応答も認められた。これらの結果から、Cal7 HA-VLP は X-179A よりも免疫原性が高いこと、ならびに G9.1 は粘膜経路で高い免疫増強効果を有することが示唆された。[浅沼秀樹、前山順一\*、山本典生\*\*、伊保澄子\*\*\*、山本三郎\*\*\*\*、藤橋浩太郎\*\*\*\*\*：\*血液安全性研究部、\*\*順天堂大・医、\*\*\*福井大・医、\*\*\*\*日本 BCG 研究所、\*\*\*\*\*アラバマ大・バーミンハム校]

## レファランス業務

### 1. サーベイランスキット作製と国内への配布

A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B/Victoria 系統、B/Yamagata 系統のレファランスウイルスから不活化抗原とウサギ免疫血清を作製して、型/亜型/系統を同定するためのインフルエンザウイルスサーベイランスキットとして、70カ所余の地方衛生研究所に配布した。本キットにより同定されたウイルスの分離情報は地衛研で病原体検出情報システムに登録され、その情報は地衛研から当室へのウイルス提供に際して有効に活用された。提供されたウイルスについて詳細な抗原性解析、遺伝子解析を行いインフルエンザの流行予測およびワクチン株選定の資料とした。[中村一哉、岸田典子、桑原朋子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、菅原裕美、佐藤 彩、秋元未来、三浦

秀佳、小川理恵、渡邊真治、小田切孝人]

### 2. フェレット感染血清作製とサーベイランスキットの海外への配布

A(H1N1)pdm09 (卵株)、A(H3N2)(細胞株)、B 山形系統(細胞株)、B ビクトリア系統(細胞株)のレファランスウイルスを用いてフェレット感染血清と不活化抗原を 11 キット作製し、抗原性解析用インフルエンザウイルスサーベイランスキットとして、わが国周辺諸国 (台湾、韓国、ミャンマー、モンゴル、ラオス、ネパール) に配布した。本キットを用いて各国で初期解析されたウイルスの提供を受け、さらに詳細な抗原性解析、遺伝子解析を行い、WHO および国内向けワクチン株選定会議へ情報提供した。[岸田典子、中村一哉、桑原朋子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、菅原裕美、佐藤 彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、渡邊真治、小田切孝人]

### 3. インフルエンザ株サーベイランスコア・サポート地衛研—感染研共同研究連携網の運用

衛生微生物技術協議会感染症部会から推薦された全国 6 地方ブロック代表地衛研およびそれらを支援する 5 つの地衛研からなる、インフルエンザ株サーベイランスコア・サポート地衛研と感染研インフルエンザウイルス研究センターとの検査・サーベイランス技術開発共同研究体制が稼働 6 年目を迎えた。今年度は、全国 73 ヶ所の地衛研を対象にしたインフルエンザウイルス核酸診断検査法についての第 3 回全国地衛研外部精度評価 (EQA) を実施した。また、全国地衛研におけるインフルエンザウイルス分離検査体制の追跡調査を目的とした 2 回目のアンケート調査結果を行った。さらには、現地での研修を要望した地衛研に対し実地研修を実施した。[小田切孝人、影山 努、今井正樹\*、渡邊真治、中内美名、高山郁代、皆川洋子\*\*、安井善宏\*\*、駒込理佳\*\*\*、三好正浩\*\*\*、長野秀樹\*\*\*、高橋雅輝\*\*\*\*、川上千春\*\*\*\*\*、長島真美\*\*\*\*\*、秋場哲哉\*\*\*\*\*、貞升健志\*\*\*\*\*、小淵正次\*\*\*\*\*、滝沢剛則\*\*\*\*\*、森川佐衣子\*\*\*\*\*、廣井聡\*\*\*\*\*、加瀬哲男\*\*\*\*\*、三好龍也\*\*\*\*\*、芦塚由紀\*\*\*\*\*、千々和勝己\*\*\*\*\*、山下育孝\*\*\*\*\*、久場由真仁\*\*\*\*\*、喜屋武尚子\*\*\*\*\*：\*東京大学医科学研究所、\*\*愛知県衛生研

究所、\*\*\*北海道立衛生研究所、\*\*\*\*岩手県環境保健研究センター、\*\*\*\*\*横浜市衛生研究所、\*\*\*\*\*東京都健康安全研究センター、\*\*\*\*\*富山県衛生研究所、\*\*\*\*\*大阪府立公衆衛生研究所、\*\*\*\*\*堺市衛生研究所、\*\*\*\*\*福岡県保健環境研究所、\*\*\*\*\*愛媛県立衛生環境研究所、\*\*\*\*\*沖縄県衛生環境研究所]

#### 4. 鳥インフルエンザウイルス(H7) および中東呼吸器症候群(MERS)コロナウイルスを検出できる蛍光 Direct RT-LAMP 法の地方自治体への導入

蛍光 Direct RT-LAMP 法を用いた簡便・迅速な鳥インフルエンザウイルス(H7)、季節性インフルエンザウイルス(H1pdm, H3)、MERS コロナウイルスを一度に検出可能な遺伝子検査キットを構築し、全国の地方衛生研究所および検疫所において、本キットの試用を希望する 15 か所の地方衛生研究所と 6 か所の検疫所に配布し、H7 亜型の鳥インフルエンザウイルスおよび MERS コロナウイルス感染疑い患者に対して、30 分以内に迅速診断を行える体制を整えた。[高山郁代、中内美名、影山 努]

#### 5. インフルエザワクチンの力価測定用標準抗原国際キャリブレーション

WHO ERL として、ワクチンの力価測定用標準抗原に関する国際キャリブレーションを実施した。具体的には、A/South Australia/55/2014 (H3N2)-cell derived [NIBSC]、A/South Australia/55/2014 (H3N2)-cell derived [CBER]、A/South Australia/55/2014 (IVR-175) (H3N2) 、 A/Hong Kong/4801/2014 (X-263B) (H3N2) 、 A/New Caledonia/71/2014 (X-257A) (H3N2) [NIBSC]、A/New Caledonia/71/2014 (X-257A) (H3N2) [TGA] 、 B/Brisbane/60/2008-cell derived 、 B/Phuket/3073/2014 、 B/Utah/9/2014-cell derived [NIBSC]、B/Utah/9/2014-cell derived [CBER] 、 A/Indonesia/5/2005 (H5N1) (IBCDC-RG2) 、 A/Anhui/1/2005 (H5N1) (NIBRG-268) 、 A/duck/Bangladesh/19097/2013 (H5N1)-cell derived 、 A/Indonesia/5/2005 (H5N1) (IBCDC-RG2)-EB66 cell derived 、 A/turkey/Turkey/1/2005 (H5N1)-cell derived 、 A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014 (H5N1)-cell derived 、 A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014 (H5N1)について、新規ロットの標準インフルエンザ HA 抗原に含有される

HA 抗原の含有量の設定を、英国、豪州、米国の生物製剤に関する国立試験研究機関である NIBSC、TGA、CBER と共同で実施した。本年度より血液・安全性研究部からたん白質含量試験の技術移管を行い、一次標準抗原のたん白質含量の測定を実施した。[原田勇一、河野直子、佐藤佳代子、板村繁之、小田切孝人]

#### 6. インフルエザワクチンの力価測定用標準抗原の性状解析

WHO ERL として、ワクチンの力価測定用標準抗原に関する国際キャリブレーションを実施する中で、A/Anhui/1/2013 (NIBRG-268)(H7N9)について、SRD 試験の再現性が通常よりも低かったため、Primary Liquid Standard(PLS)の物理化学的な性状解析を実施した。動的光散乱計(DLS)と透過電子顕微鏡(TEM)によって粒子状態を解析したところ、当該 PLS に異常な粒子凝集が起こっていることが判明し、英国、豪州、米国の各 ERL に情報提供した。[嶋崎典子、板村繁之]

#### 7. インフルエンザ HA ワクチンの国家検定のための標準抗原・参照抗血清の作製

平成 27 年度のインフルエンザ HA ワクチンのワクチン製造株である A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1)pdm09、A/Switzerland/9715293/2013 ( NIB-88 ) (H3N2) 、 B/Phuket/3073/2013、B/Texas/2/2013 の 4 株について国家検定の力価試験に使用する参照抗インフルエンザ HA 抗血清と標準インフルエンザ HA 抗原（一元放射免疫拡散試験用）を作製し、標準抗原に含有される HA 抗原の含有量、及び参照抗血清の至適濃度の設定を実施し、本年度国内標準品として制定した。また、B 型ウイルスの 2 株については、SRD 試験方法の評価研究結果に基づき、SRD 試験の実施区分を制定した。[嶋崎典子、原田勇一、河野直子、佐藤佳代子、板村繁之、小田切孝人]

#### 8. インフルエンザ HA ワクチンの国家検定のための参照インフルエンザ HA ワクチンの作製

国家検定の力価試験として一元放射免疫拡散 (SRD) 試験あるいは卵中和試験を行うこととされているが、通常は SRD 試験が力価試験として実施されている。SRD 試験で HA 含量が規定されたワクチンのマウスにおける

免疫原性を確認することを主な目的として、卵中和試験に使用するウイルス株ごとに 15 μg/ドーズの HA 抗原を含有する参照インフルエンザ HA ワクチンを作製している。本年度の参照ワクチンとして、平成 27 年度のワクチン製造株である A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1)pdm09、A/Switzerland/9715293/2013 (NIB-88) (H3N2)、B/Phuket/3073/2013、B/Texas/2/2013 の 4 株のワクチンを含有するものを作製した。参照ワクチンの作製に使用する原液について HA 価測定及び分画試験を実施して原液の品質規格を確認した。また、SRD 試験によって原液の HA 含量を測定して、ウイルス株ごとに 15 μg/ドーズの HA 抗原を含有する参照インフルエンザ HA ワクチンを調製した。得られた参照ワクチンについて、物理化学試験（たん白質含量、チメロサル含量）、マウス白血球数減少試験を実施して規格に適合していることを確認し、卵中和試験によってその力価を測定した。[佐藤佳代子、河野直子、嶋崎典子、原田勇一、板村繁之、楠英樹\*、福田靖\*\*、小田切孝人：\*血液・安全性研究部、\*\*細菌第 2 部]

#### 9. 沈降インフルエンザワクチン(H5N1 株)の国家検定のための標準抗原・参照抗血清の作製

国家備蓄用の沈降インフルエンザワクチン(H5N1 株)のワクチン製造株である A/Indonesia/05/2005 (Indo05/PR8-RG2) (H5N1)について国家検定の力価試験に使用する標準インフルエンザ HA 抗原（一元放射免疫拡散試験用）の更新ロットを作製し、標準抗原に含有される HA 抗原の含有量の設定を実施し、国内標準品として制定した。[嶋崎典子、原田勇一、板村繁之、小田切孝人]

#### 10. 標準インフルエンザワクチン(CCA 価用)の作製

使用期限をむかえる標準インフルエンザワクチン(CCA 価用)について、新規ロットを作製し、含有される抗原の CCA 価を測定し、本年度国内標準品として制定した。[佐藤佳代子、高橋仁、鈴木康司、板村繁之、小田切孝人]

### サーベイランス業務

#### 1. 2015/16 シーズンのインフルエンザウイルス国内流行

#### 株の抗原性解析

全国の地衛研から提供を受けた A(H1N1)pdm09 : 297 株、A(H3N2) : 110 株、B 山形系統 : 139 株、B ビクトリア系統 : 132 株について抗原性解析を行った。また、病院から臨床検体の提供を受けて分離培養した A(H1N1)pdm09 : 49 株、A(H3N2) : 4 株、B 山形系統 : 21 株、B ビクトリア系統 : 44 株についても同様に解析した。2015/16 シーズンは A(H1N1)pdm09 ウイルスが流行株の半数を占めた。次に B 型ウイルスが 4 割を占め、H3 ウイルスは 1 割未満と最も少なかった。B 型ウイルスの割合は山形系統株が 55%、ビクトリア系統株が 45%と拮抗した。A(H1N1)pdm09 分離株のほとんどはワクチン株である A/California/7/2009 類似株であった。A(H3N2)分離株はワクチン株の A/Switzerland/9715293/2013 と抗原性の異なる株が増加し、流行株の半数を占めたことから、ワクチン株変更の必要性が示唆された。B 山形系統および B ビクトリア系統の流行株は、いずれも B 山形系統ワクチン株 B/Phuket/3073/2013、B ビクトリア系統ワクチン株 B/Texas/02/2013 にそれぞれ抗原性が類似していた。[岸田典子、中村一哉、桑原朋子、佐藤 彩、秋元未来、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、菅原裕美、小川理恵、三浦秀佳、渡邊真治、小田切孝人]

#### 2. アジア地域および近隣諸国で分離されたインフルエンザウイルス流行株の抗原性解析

WHO インフルエンザ協力センターとして、東南アジア諸国および近隣諸国から 294 株（台湾 73 株、ミャンマー 10 株、ラオス 77 株、ネパール 92 株、モンゴル 25 株、インド 10 株、ベトナム 7 株）のインフルエンザ分離株を入手し、遺伝子解析および抗原性解析を行なった。A(H1N1)pdm09 流行株は、ワクチン株 A/California/07/2009 の類似株が主流を占めた。A(H3N2)ウイルスのほとんどが 2014/15 シーズンワクチン株 A/New York/39/2012 との抗原性の乖離が認められた。2015 年秋期以前の分離株の多くは 2015/16 シーズンワクチン株 A/Switzerland/9715293/2013 と抗原的に類似していたが、それ以降 2015/16 シーズンの分離株は抗原性が異なる株が増加傾向にあった。B 型ウイルスではビクトリア系統と山形系統が混合流行し、その割合は国、地域により違いが認められた。ビクトリア系統分離株は B/Brisbane/60/2008、

B/Texas/02/2013 の抗原性類似株が、山形系統分離株は B/Phuket/3073/2013 抗原性類似株が主流であった。これらの解析結果は、ウイルス提供国へ還元され、WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークにおける近隣諸国と感染研の連携や WHO によるインフルエンザワクチン株選定に貢献した。[中村一哉、岸田典子、桑原朋子、佐藤彩、秋元未来、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、高下恵美、菅原裕美、小川理恵、渡邊真治、小田切孝人]

### 3. A/H3N2 亜型分離株の抗原性解析手法の改良

近年の A/H3N2 亜型株は HA 蛋白質による赤血球凝集活性が極めて弱く、従来、分離株抗原性解析の主流な手法として用いられてきた HI 試験の実施が困難な状況になっている。そこで中和試験法の分離株抗原性解析への応用の可否を検討し、HI 試験による抗原性解析の代替手法としての有用性を確認するとともに、新たな分離株抗原性解析手法として確立、導入を行った。本手法によって 2014/15 および 2015/16 シーズンの A/H3N2 亜型分離株の抗原性について必要十分な解析を行い、得られた結果は WHO および国内向けワクチン株選定会議へ提供、活用された。[中村一哉、桑原朋子、岸田典子、秋元未来、佐藤彩、渡邊真治、小田切孝人]

### 4. 2015/16 シーズンのヒトインフルエンザウイルス流行株の遺伝子解析

インフルエンザウイルスの HA と NA 遺伝子の変化に関する情報は、次シーズンのインフルエンザ流行予測とワクチン株選定時の基盤となり、公衆衛生上極めて重要な役割を担っている。全国地衛研の協力の元に、本シーズンは A(H1N1)pdm09 亜型 131 株、A(H3N2)亜型 88 株、B 型山形系統 77 株、B 型ビクトリア系統 52 株について HA 及び NA 遺伝子の系統樹解析を行った。15/16 シーズンに流行の主流であった A(H1N1)pdm09 亜型は、HA 遺伝子系統樹上でクレード 6B (K163Q, A256T)に属し、さらにサブクレード 6B.1 (S84N, S162N, I216T)と 6B.2 (V152T, V173I, E491G, D501E)を形成した。A(H3N2)亜型は全てクレード 3C.2a (N144S, F159Y, K160T, N225D, Q311H)に属し、さらに N171K, I406V, G484E サブクレード、R142K, Q197R サブクレードを形成した。B 型山形系統は全てクレード 3 (S150I, N165Y, N202S, S229D)に、ビクトリア系

統は全てクレード 1A(N75K, N165K, S172P)に属した。データベース充実化のために、上述した株のうち 56%については全セグメントの遺伝子解析を実施した。なお、解析した遺伝子配列はインフルエンザウイルスデータベース GISAID へ登録した。[藤崎誠一郎、白倉雅之、岸田典子、中村一哉、高下恵美、桑原朋子、三浦秀佳、菅原裕美、佐藤彩、小川理恵、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人]

### 5. インフルエンザウイルス流行株の抗インフルエンザ薬感受性試験

薬剤耐性ウイルスの検出状況を逐一把握し、速やかに情報発信することは公衆衛生上極めて重要である。平成 27 年度には、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルの 4 薬剤を対象として、国内外の A(H1N1)pdm09 分離株 342 株、A(H3N2)分離株 319 株、B 型分離株 453 株の薬剤感受性を解析した。その結果、A(H1N1)pdm09 では H275Y 耐性変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性株が 6 株検出され、A(H3N2)では R292K 耐性変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性株が 1 株検出された。耐性株はいずれも散発例で、地域への感染拡大は認められなかった。薬剤耐性株サーベイランスで得られた結果は、NESID (感染症サーベイランスシステム)を通して毎週、各関係機関に情報提供した。また感染症疫学センターの IASR ウェブサイトにおいて毎週一般公開し、耐性株の流行状況に関する情報提供を行った。[高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人]

### 6. 季節性インフルエンザワクチン候補株の鶏卵における分離

現行のインフルエンザワクチンは、臨床検体を発育鶏卵 (鶏卵) に接種し、鶏卵で分離されたウイルスを用いて作製しなければならない。より有効性の高いワクチン株の選定に貢献することを目的として、全国の地方衛生研究所から分与された臨床検体を鶏卵に接種し、ワクチン候補株の分離を試みた。その結果、ワクチン候補株として 4 株のウイルス [A(H1N1)pdm09 亜型 2 株、A(H3N2)亜型 1 株、B 型山形系統 1 株] を鶏卵で分離することに

成功した。そのうちの3株に対してはフェレット感染血清を作製し流行株との反応性を調べた。その結果、どの血清も流行株とよく反応することが明らかとなり、ワクチン候補株となり得ることが分かった。[桑原朋子、中村一哉、岸田典子、秋元未来、佐藤 彩、渡邊真治、小田切孝人]

#### 7. 株サーベイランス体制の強化に関する研究

平成25年度に行った地方衛生研究所(地衛研)におけるインフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点の把握のためのアンケート調査に続いて、その追跡アンケート調査を行った。前回同様に分離効率の低い地衛研のうち、研修要望のあった研究所に対し研修を行った。我が国の株サーベイランス体制を維持するためには、人材育成が不可欠である。国-地方自治体-感染研が連携して、この問題に取り組む必要がある。[今井正樹\*、渡邊真治、小田切孝人：\*東大医科学研究所]

#### 8. 我が国に飛来する野生水禽における A 型鳥インフルエンザウイルスの保有調査

2003年末以降、東アジアの家禽で発生したH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスが東南アジア、中近東、アフリカ、ヨーロッパへと拡散した。この感染拡大経路は渡り鳥の飛行ルートとも関連していることから、渡り鳥によってこれら鳥インフルエンザウイルスが我が国に持ち込まれる可能性がある。また、最近ではH5N6、H7N7、H7N9、H6N1、H10N8、H9N2亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が東アジアで報告されており、鳥インフルエンザウイルスの国内での流行状況を把握する事は重要である。これらウイルスの我が国への侵入をモニターし、ウイルスライブラリーの構築を目的として、地方衛生研究所の協力のもと、渡り鳥より採取した糞便を用いて鳥インフルエンザウイルスの分離培養を試みたが、本年度はウイルス分離ができなかった。[高山郁代、中内美名、影山 努、小田切孝人]

#### 9. 日本のブタにおける新型インフルエンザウイルスの発生の監視

全国10カ所の地方衛生研究所に依頼し、ブタの鼻腔あるいは気管から採取した拭い液をMDCK細胞に接種し

て、ブタからのインフルエンザウイルス分離調査を行ったが、本年度は、いずれの地方衛生研究所からも分離報告はなかった。[高山郁代、中内美名、影山 努、小田切孝人]

#### ワクチンの安定供給に関する業務

##### 1. 季節性インフルエンザワクチン製造株候補の増殖、検討、交付

2016/2017シーズン用ワクチン株を選定するため、候補株を輸入し、GMP準拠施設内で、マスターストックを増殖後、保存した[H3N2亜型：A/New Caledonia/71/2014(X-257A), A/Hong Kong/7127/2014(X-261, NIB-93), A/Hong Kong/4801/2014(X-263, X-263A, X-263B), A/Victoria/673/2014(NIB-92), A/South Australia/9/2015(X-265), A/Saitama/103/2014, B型：B/California/12/2015(BX-59A, BX-59B)]。ワクチン製造所で増殖性、蛋白収量等の検討を行うため、H3N2亜型8株を試験交付、A型H3N2亜型3株、B型2株を仮交付した。ワクチン製造所における、増殖性、蛋白収量等の情報は、2016/17シーズンワクチン株選定会議に供され、ワクチン製造株選定資料として共有された。[鈴木康司、有田知子、信澤枝里、小田切孝人]

##### 2. H27年度H5N1備蓄ワクチン株選定資料の作成

(i)H27年度で期限が切れる鶏卵培養H5N1備蓄ワクチン株クレード2.2の更新について

現在の備蓄株 A/bar headed goose/Qinghai/1A/2005(H5N1)(SJRG-163222)に代わる新規株として A/Egypt/N03072/2010(H5N1)(IDCDC-RG29)への変更の妥当性を検討するため、それぞれの株を用いて作製されたワクチンを接種した被験者の血清と近年のクレード2.2に属するウイルスとの反応性を中和試験により調べた。ワクチン接種前後(接種前、2回目接種後21日目)の血清50検体ずつを用いて、クレード2.2に属するワクチン株4株(SJRG-163222、IDCDC-11、IDCDC-RG29、IDCDC-RG13)との反応性を検討した。その結果、SJRG-163222接種者の接種後血清では、ホモ価が40以上の血清のうち、少なくとも76%以上が、近年のワクチン株(IDCDC-11、IDCDC-RG29、IDCDC-RG13)に対して中和抗体価40以上を示したのに対し、IDCDC-RG29接種

者血清は、SJRG-163222 に対しては、32%、近年のワクチン株(IDCDC-11、IDCDC-RG29、IDCDC-RG13)に対しては、少なくとも 60%以上が接種後中和抗体価 40 以上を示した。その結果、ワクチン株としては、SJRG-163222 の方が交差反応性の高い中和抗体を誘導する可能性が示唆された。[有田知子、鈴木康司、信澤枝里、小田切孝人]

(ii)細胞培養 H5N1 ワクチン接種後の交差反応性の検討  
平成 27 年度の備蓄ワクチン株としては、交差反応性が期待できる細胞培養 H5N1 ワクチン株 A/Indonesia/5/2005(H5N1)(CDC-RG2)が選定された(ワクチン接種時、アジュバント(AS03)添加)。しかし、選定時に検討されたのは、当該ワクチン接種者の接種後血清の各クレードのワクチン株に対する中和抗体価の比較であった。そのため、近年分離された各クレードの野生株に対する中和抗体価の検討も必要とされ、当該ワクチン接種前後の血清を用いて、野生株 7 株を用いた中和試験を行った。その結果、接種後に中和抗体価 40 以上を示す割合は、A/Vietnam/VP13-28H/2013(H5N1)[クレード 1.1] 4%、A/Indonesia/NIHRD12379/2012(H5N1)[クレード 2.1.3.2] に対して 80%、ワクチンの元株である A/Indonesia/5/2005(H5N1)に対して 100%、A/Egypt/N04915/2014(H5N1)[クレード 2.2.1]に対して 25%、A/chicken/Bangladesh/11rs1984-30/2011(H5N1)[クレード 2.3.4.2]に対して 24%、A/chicken/Shimane/1/2010(H5N1)[クレード 2.3.2.1c] に対して 12%、A/chicken/Kumamoto/1-7/2014(H5N8)[クレード 2.3.4.4] に対して 0%であった。当ワクチンは当該クレード 2.1.3.2 に属するワクチン株の元株および近年の株には高い中和抗体を誘導していたが、他クレードの株に対しては十分な中和抗体を誘導できるとは言えなかった。  
[有田知子、鈴木康司、信澤枝里、小田切孝人]

## 品質管理に関する業務

### 1. インフルエンザ HA ワクチンの力価試験の精度管理及び規格確認

インフルエンザ HA ワクチンは毎年ワクチン株が見直しされるため、ワクチンの国家検定の力価試験として実施されている一元放射免疫拡散(SRD)試験の測定精度が一定の範囲内にあるように毎年確認して調整する必要がある。更に、平成 27 年度からの 4 価ワクチン導入にと

ない、生物学的製剤基準の一部改正が実施され、B 型株の SRD 試験方法の実施区分が制定された。このような状況に対応するため、参照インフルエンザ HA ワクチンを使用して各試験の測定精度、また、各製造所の測定値との乖離についての検討を実施した。また、生物学的製剤基準の一部改正によって蛋白質含量試験の規格は変更となったが、これまで蛋白質含量試験やマウス白血球数減少試験において、毎年のワクチンが規格に適合しているのか確認してきたため、本年も各ワクチン製造所で試作されたワクチンについて測定を実施して規格に適合していることを確認するとともに、各製造所の測定値との乖離について検討した。[嶋崎典子、原田勇一、河野直子、高橋仁、佐藤佳代子、板村繁之、楠英樹\*、福田靖\*\*、小田切孝人：\*血液・安全性研究部、\*\*細菌第 2 部]

### 2. 季節性インフルエンザワクチン製造用候補ウイルス株の品質管理試験の実施

2015-16 年シーズンのインフルエンザワクチン製造用候補ウイルス A(H3N2)亜型 7 株、B 型 4 株の試験交付株、A(H3N2)亜型 3 株、B 型 2 株の仮交付株について、抗原分析及び HA、NA 遺伝子の遺伝子解析を実施して遺伝的・抗原的安定性を解析し、ワクチン製造用株としての適性を確認した。また、インフルエンザワクチン製造用に試験交付及び仮交付株の無菌試験を実施した。解析結果は、インフルエンザワクチン株選定のための検討会議等を通じて関係各機関と情報を共有した。[原田勇一、佐藤佳代子、河野直子、中村一哉、佐藤 彩、信澤枝里、板村繁之、小田切孝人]

## 国際協力関係業務

### 1. ミャンマーNIC 研究者に対するサーベイランスの解析技術の研修

インフルエンザウイルスサーベイランスのための技術向上を目的として、2016 年 1 月 18~29 日に、ミャンマーNIC から Pan Ei Soe 氏と Zin Pwint Phyu Aung 氏の 2 名を招聘した。研修期間中は、MDCK 細胞培養およびその管理法、MDCK 細胞によるウイルスの分離培養法、赤血球凝集試験と赤血球凝集阻止試験を用いた分離ウイルスの型・亜型・系統の同定および抗原性解析試験について研修を実施した。また、中和試験、発育鶏卵によるウイ

ルス分離、遺伝子系統樹解析についても講習を行なった。

[岸田典子、中村一哉、桑原朋子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、高山郁代、中内美名、影山 努、渡邊真治、小田切孝人]

## 2. WHO 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス強化のためのワーキンググループへの参加

WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークの抗インフルエンザ薬耐性ワーキンググループのメンバーとして、2013 年第 21 週から 2014 年第 20 週に検出された世界 113 ヶ国の 10,641 株のインフルエンザウイルスについて、抗インフルエンザ薬に対する感受性試験の結果を総括した。その結果、耐性株の検出率は 1.9%で、前シーズンの検出率 0.6%より上昇していることが明らかになった。[高下恵美]

## 3. 国際インフルエンザウイルスデータベース(GISAID)ワーキンググループへの参加およびデータベース改良への貢献

2006 年 8 月に公開されたインフルエンザウイルスの国際データベース(GISAID)は、ヒト及び鳥インフルエンザウイルスについての情報を各国の研究者に無償で提供することを目的としている。感染研を含め各国の GISAID 技術担当者が GISAID 利用上の問題点、要望などを提示・検討しており、これに基づいて現在、GISAID version 2 へのアップデートが進められている。[藤崎誠一郎、高下恵美、白倉雅之、三浦秀佳、渡邊真治、小田切孝人]

## 4. WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークにおける流行株の 2 次元的抗原性分析への参加と協力

WHO 世界インフルエンザ監視対応システムメンバーである Cambridge 大学グループが開発した 2 次元的ウイルス抗原性分析法 (Cartography 法) を用いて流行株の解析をするため、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型ウイルスの抗原解析データおよび遺伝子解析データを Cambridge 大学へ提供した。これらの成績は、WHO ワクチン株選定会議で協議され、ワクチン株選定に貢献した。[高下恵美、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤 彩、小川理恵、秋元未来、三浦秀佳、渡邊真治、小田切孝人]

## 5. WHO 関連会議への出席とインフルエンザワクチン株選定および選定法の改良に関する協議への参画

9 月と 2 月に WHO ジュネーブ本部で開催されたインフルエンザワクチン株選定会議へ出席し、国内および日本周辺諸国から収集したウイルスの性状、薬剤耐性株の検出状況、ワクチン接種後の抗体保有状況、交差反応性などの情報提供をし、次年度のワクチン株選定を海外の WHO インフルエンザ協力センターと共に行った。2016 年度用南半球向けワクチン株選定会議では、議長国として WHO 推奨株の取りまとめを行った。また、2015 年 11 月に香港で開催されたワクチン株選定法改良会議では、WHO ワクチン推奨株の決定時期の見直し戦略策定班の議長を担当した。[小田切孝人、渡邊真治、中村一哉、岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、桑原朋子、菅原裕美、佐藤 彩、小川理恵、秋元未来、三浦秀佳]

## 6. ベトナム・ホーチミン・パスツール研究所におけるインフルエンザおよびウイルス性呼吸器感染症診断、さら

い株サーベイランスに関わる基本的な技術の技術支援  
ベトナム・ホーチミン・パスツール研究所にて、これまで当センターで構築したリアルタイム RT-PCR 法および RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルスの亜型同定、ウイルス性呼吸器感染症の検出についての技術供与を行った。また、ベトナムにおけるインフルエンザ株サーベイランスの強化を目的に、サーベイランスに関わる基本的な技術 (細胞培養、ウイルス分離、遺伝子解析、抗原性解析など) の技術指導および現地流行状況の情報収集を行った。[高山郁代、白倉雅之、影山 努]

## 7. 国際協力機構 (JICA) 研修への参画

JICA の主催する「ポリオ及び麻疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術」研修に講師として参画し、インフルエンザとインフルエンザワクチンについて講義を行った。[渡邊真治]

## 8. WHO A 型インフルエンザウイルス亜型検出 PCR プロトコールに関する Working Group Meeting への参加

平成 27 年 6 月 23 日～24 日にジュネーブで開催された WHO A 型インフルエンザウイルス亜型検出 PCR プロト

コールに関する Working Group Meeting に参加し、WHO の A 型インフルエンザウイルス亜型検出 PCR プロトコールのアップデートについてと諸外国のナショナルインフルエンザセンターに対して行っているインフルエンザウイルスの PCR 亜型診断の精度管理およびその継続性について、他の WHO インフルエンザ協力センター、WHO H5 リファレンスラボラトリー、ナショナルインフルエンザセンター、OFFLU と協議した。[影山 努]

#### 9. 鳥インフルエンザ感染疑い患者のインフルエンザウイルスの遺伝子検査

ラオス NIC より送付された鳥インフルエンザ感染疑い患者から採取された 5 臨床検体に対して、インフルエンザウイルスの遺伝子検査を行った。[影山 努、中内美名、高橋 仁、高山郁代、小田切孝人]

#### 10. ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)における高危険度病原体の実験室診断能力強化への技術支援

ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)において国際協力機構(JICA)が実施している BSL3 実験室の供与と技術移転のプロジェクトに参加し、NIHE 及び地域研究所(ホーチミン・パスツール研究所、ニャチャン・パスツール研究所、タイグエン衛生疫学研究所の職員を対象とした研修会「Influenza virus training course in in NIHE and Nhatrang Pasteur Institute (2015 年 7 月 6 日-10 日)」を NIHE およびニャチャン・パスツール研究所において開催し、RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの型・亜型同定法に関する外部精度評価、RT-LAMP 法を用いたインフルエンザウイルスの型・亜型同定法およびリアルタイム RT-PCR 法を用いた薬剤耐性株のスクリーニング方法について講義および実技指導を行った。[影山 努]

#### 11. モンゴル National Influenza Center におけるインフルエンザおよびウイルス性呼吸器感染症診断に関する技術支援

モンゴル NIC において、これまで当センターで構築したリアルタイム RT-PCR 法および RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルスの亜型同定、ウイルス性呼吸器感染症の検出についての技術供与を行った。[中内美名、影山 努]

#### 12. 米国 CDC における Information meeting on surveillance on drug resistance influenza virus への参加

平成 27 年 6 月 8 日に米国 CDC で開催された Information meeting に参加し、日本と米国の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスについて情報交換を行った。[高下恵美]

### 研修業務

#### 1. 平成 27 年度所内で実施された各種研修プログラムにおける講義

平成 27 年 4 月 14 日に実施された FETP 初期研修、平成 27 年 10 月 14 日に実施された感染症危機管理研修会および平成 27 年 10 月 29 日に実施された医師卒後研修にて、それぞれ季節性および動物由来インフルエンザウイルスとワクチン開発の現状と問題点に関する講義を担当した。[渡邊真治、小田切孝人]

#### 2. 細胞培養およびウイルス分離に関する技術指導

2 か所の地方衛生研究所に対して細胞培養およびウイルス分離に関する技術指導を行った。[今井正樹\*、渡邊真治：\*東大医科学研究所]

#### 3. 検疫所へのインフルエンザウイルスの遺伝子検出および亜型同定法についての診断検査技術研修

主要検疫所 13 ヶ所の検査担当職員を感染研に招聘し、リアルタイム RT-PCR 検査を中心とした A 型インフルエンザウイルスの亜型同定法およびマーカー入陽性コントロールを導入した遺伝子検査の精度管理に関する診断検査技術研修を行った。研修では各検疫所からの検査対応相談にも個別に対応し、研修成果が現場で反映されるように連携の強化が図られた。また、遺伝子検査の時間短縮および検査精度の向上のため、遺伝子検査で使用する試薬を変更し、検疫所における鳥インフルエンザ検査マニュアルの改訂を行った。[影山 努、高山郁代、中内美名]

#### 4. インフルエンザの実験室診断についての本邦研修

平成 27 年 11 月 29 日から 12 月 12 日まで、モンゴルの National Influenza Center より研究員 2 名を、平成 28 年 3



月 22 日から 30 日までベトナムの NIC であるホーチミン・パスツール研究所から研究員 2 名を招聘して、インフルエンザウイルスの分離・培養で使われる MDCK 細胞の維持管理法やウイルスの分離法、インフルエンザ遺伝子診断法などに関する技術研修を行なった。[影山 努、高山郁代、中内美名、小田切孝人]

#### 5. インフルエンザおよびウイルス性呼吸器感染症診断に関する技術指導

ベトナムバクマイ病院において、リアルタイム RT-PCR 法および RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルスの亜型同定、ウイルス性呼吸器感染症の検出について技術指導を行った。[影山 努、高山郁代]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

1. Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013-2014 influenza season in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 May;59(5):2607-17.
2. Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC, Tashiro M. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. *Antiviral Res*. 2015 May;117:27-38.
3. Sriwilaijaroen N, Suzuki K, Takashita E, Hiramatsu H, Kanie O, Suzuki Y. 6SLN-lipo PGA specifically catches (coats) human influenza virus and synergizes neuraminidase-targeting drugs for human influenza therapeutic potential. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Oct;70(10):2797-809.
4. Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015. *Jpn J Infect Dis*. 2016;69(1):83-6.
5. Zhao D, Fukuyama S, Sakai-Tagawa Y, Takashita E, Shoemaker JE, Kawaoka Y. C646, a Novel p300/CREB-Binding Protein-Specific Inhibitor of Histone Acetyltransferase, Attenuates Influenza A Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec 28;60(3):1902-6.
6. Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T. Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2016 Mar;22(3).
7. Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E. Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain. *Vaccine*. 2016. Jan. 34(3) 328-33.
8. Rhee SY, Blanco JL, Jordan MR, Taylor J, Lemey P, Varghese V, Hamers RL, Bertagnolio S, Rinke de Wit TF, Aghokeng AF, Albert J, Avila-Rios S, Bessong PO, Brooks JI, Boucher CA, Brumme ZL, Busch MP, Bussmann H, Chaix ML, Chin BS, D'Aquin TT, De Gascun CF, Derache A, Descamps D, Deshpande AK, Djoko CF, Eshleman SH, Fleury H, Frange P, Fujisaki S, Harrigan PR, Hattori J, Holguin A, Hunt GM, Ichimura H, Kaleebu P, Katzenstein D, Kiertiburanakul S, Kim JH, Kim SS, Li Y, Lutsar I, Morris L, Ndembi N, Ng KP, Paranjape RS, Peeters M, Poljak M, Price MA, Ragonnet-Cronin ML, Reyes-Terán G, Rolland M, Sirivichayakul S, Smith DM, Soares MA, Soriano VV, Ssemwanga D, Stanojevic M, Stefani MA, Sugiura W, Sungkanuparph S, Tanuri A, Tee KK, Truong HH, van de Vijver DA, Vidal N, Yang C, Yang R, Yebra G, Ioannidis JP, Vandamme AM, Shafer RW. Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an

- individual-patient- and sequence-level meta-analysis. PLoS Med. 2015 Apr 7;12(4):e1001810.
9. Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzuki Y, Ishii K, Kishida N, Shirakura M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Ferret hepatitis E virus infection induces acute hepatitis and persistent infection in ferrets. Vet Microbiol. 183: 30-36. 2016.
  10. Shoemaker JE, Fukuyama S, Eisfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y. An Ultrasensitive Mechanism Regulates Influenza Virus-Induced Inflammation. PLoS Pathog. 11:e1004856, 2015.
  11. Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Molecular Determinants of Virulence and Stability of a Reporter-Expressing H5N1 Influenza A Virus. J Virol. 89:11337-11346, 2015.
  12. Katsura H, Fukuyama S, Watanabe S, Ozawa M, Neumann G, Kawaoka Y. Amino acid changes in PB2 and HA affect the growth of a recombinant influenza virus expressing a fluorescent reporter protein. Sci Rep. 6:19933, 2016.
  13. Shimasaki N, Nojima Y, Okaue A, Takahashi H, Kageyama T, Hamamoto I, Shinohara K. A Novel Method of Safely Measuring Influenza Virus Aerosol Using Antigen-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Performance Evaluation of Protective Clothing Materials. Biocontrol Sci., 2016;21(2):81-89.
  14. Shimasaki N, Hara M, Kikuno R, Shinohara K. A highly sensitive assay using synthetic blood containing test microbes for evaluation of the penetration resistance of protective clothing material under applied pressure. Biocontrol Sci., 2016;21(3):161-169.
  15. Sugimura T, Takahashi H, Jounai K, Ohshio K, Kanayama M, Tazumi K, Tanihata Y, Miura Y, Fujiwara D and Yamamoto N. Effects of oral intake of plasmacytoid dendritic cells-stimulative lactic acid bacterial strain on pathogenesis of influenza-like illness and immunological response to influenza virus. British Journal of Nutrition, 114(5):727-733, 2015.
  16. Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro T, Asanuma H. Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan. PLOS ONE 2015; 10(6): e0130208.
  17. Asanuma H, Ohori J, McGhee JR, Fujihashi K. Past Efforts and Future Prospects for a Nasal Influenza Vaccine. Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs. 2015 VOL.2 ISSUE:1 13-26.
2. 和文発表
    1. 高下恵美: 4th isirv-AVG Conference Novel Antiviral Therapies for Influenza and other Respiratory 参加報告. インフルエンザ. 56:228-9, 2015.
    2. 高下恵美: オセルタミビル・ペラミビル耐性インフルエンザの状況と対処法は? インフルエンザ診療ガイド 2015-16. 173-6, 2015.
    3. 渡邊真治: 南半球と北半球のインフルエンザ流行に、関連性はあるのでしょうか? インフルエンザ. 16(2):28, 2015.
    4. 渡邊真治: 4 種混合インフルエンザワクチンで感染リスクは減るのでしょうか? インフルエンザ. 17(1):28, 2016.
    5. 影山 努 必携 検査室の感染管理 高病原性病原体の感染が疑われる患者の検査 1 )鳥インフルエンザ (H5N1) および (H7N9). Medical Technology 43(13):1436-1441, 2015
    6. 影山 努, 小田切孝人 鳥インフルエンザの流行状況について. 病原微生物検出情報 36(11):220-221, 2015
- ## II. 学会発表
1. 国際学会
    1. Kaida A, Yamamoto SP, Iritani N, Kohdera U, Togawa M, Amo K, Nishigaki T, Kageyama T, Kubo H. Re-emergence of enterovirus D68 in 2013, Osaka, Japan. 31st Clinical Virology Symposium, Florida 26-29 April 2015.
    2. Takahashi H, Nakauchi M, Nagata S, Odagiri T,

- Kageyama T. Development of monoclonal antibodies specific for H7 HA and their application to rapid detection of influenza A/H7N9 virus. Negative Strand Virus Meeting 2015, Siena 14-19 June 2015.
3. Takashita E., Kiso M, Fujisaki S., Yokoyama M, Nakamura K., Shirakura M., Sato H, Odagiri T., Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013-2014 influenza season in Japan. 4th isirv-AVG Conference. Austin, USA. June 2015.
  4. Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Ozawa H, Shimizu K, Usuku S, Mitamura K, Takashita E., Fujisaki S., Odagiri T. Genetic analysis of influenza B viruses isolated during the five seasons in Yokohama, Japan. 4th isirv-AVG Conference. Austin, USA. June 2015.
2. 国内学会
1. 板村繁之、河野直子、孫 琳、藤 博幸、大西和夫 : 次世代シーケンスを用いたインフルエンザワクチンに应答する抗体レパトアの網羅的解析(1) 第29回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 東京 2015年5月
  2. 河野直子、板村繁之、孫 琳、藤 博幸、大西和夫 : 次世代シーケンスを用いたインフルエンザワクチンに应答する抗体レパトアの網羅的解析(2) 第29回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 東京 2015年5月.
  3. 大場邦弘、高山郁代、中内美名、高橋 仁、影山 努 インフルエンザ A 型感染症における亜型別の小児入院診断名の比較 第29回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 東京 2015年5月
  4. Kayoko Sato, Manabu Ato, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura : Influenza vaccines activate NF- $\kappa$ B in macrophages through TLR3, TLR7, and RIG-I. International Conference of Cancer Immunotherapy and macrophages 2015 東京 2015年7月
  5. 影山 努 海外における鳥インフルエンザの発生状況と国内の検査体制 衛生微生物技術協議会総会第35回研究会 仙台 2015年7月
  6. 仙波晶平、高山郁代、中内美名、高橋 仁、米川俊広、瀬川雄司、影山 努 RT-LAMP法による多項目同時遺伝子検査法を用いたインフルエンザウイルスの型・亜型判別 第22回日本遺伝子診療学会横浜 2015年7月
  7. 野島康弘、嶋崎典子、岡上晃、高橋 仁、影山 努、浜本いつき、篠原克明 防護服素材の防護性能評価のための、antigen-capture ELISAを用いたインフルエンザウイルスエアロゾルを安全に測定する新規方法 日本防菌防黴学会 第42回年次大会 豊中 2015年9月
  8. 大場邦弘、名井栄実菜、秋山聡香、小花奈都子、川口隆弘、林健太、野田雅裕、吉田知広、小鍛治雅之、高橋 仁、高山郁代、中内美名、影山 努 2014/15シーズンのインフルエンザ流行期における小児ウイルス性呼吸器感染症の検討 第47回日本小児感染症学会総会・学術集会 福島 2015年10月
  9. 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤 彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 : 2014/15シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況 第47回日本小児感染症学会総会・学術集会 福島 2015年10月
  10. 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘、高下恵美 : 横浜市における過去5シーズンのB型インフルエンザウイルスの遺伝子解析 第47回日本小児感染症学会総会・学術集会 福島 2015年10月
  11. 嶋崎典子、原田勇一、落合雅樹、板村繁之、小田切孝人 : 4価インフルエンザ HA ワクチン B 型 2 系統株 HA 抗原量を適正に測定するための一元放射免疫拡散試験法の評価及び実施手順の確立 第19回日本ワクチン学会学術集会 愛知 2015年11月
  12. Takashita E., Fujisaki S., Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M., Odagiri T. : Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
  13. Watanabe S., Nakamura K., Fujisaki S., Shirakura M., Takashita E., Kishida N., Kuwahara T., Sato A., Ogawa R.

- Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan : Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
14. Kawakami C, Takashita E, Fujisaki S, Saikusa M, Usuku S, Odagiri T, Mitamura K : Genetic Analysis of Influenza B Viruses isolated during the Five Seasons in Yokohama. 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
15. Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y. A novel host factor plays a key role in the nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein complexes. 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
16. Dongming Z, Fukuyama S, Yamada S, Tiago L, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of an H5N1 influenza A virus expressing a reporter gene. 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
17. 河野直子, 大西和夫, 孫 琳, 藤 博幸, 板村繁之 : 増殖基材の異なるインフルエンザワクチンに应答する抗体レパトアの網羅的解析. 第19回日本ワクチン学会学術集会 愛知 2015年11月
18. 嶋崎典子, 原田勇一, 板村繁之, 小田切孝人 : 4価インフルエンザHAワクチンの一価放射免疫拡散試験におけるB型2系統ワクチン株HA蛋白の交差反応性の解析. 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
19. 原田勇一, 高橋 仁, 浜本いつき, 浅沼秀樹, 許斐奈美, 小田切孝人, 信澤枝里 : 季節性細胞培養インフルエンザワクチン製造株開発への取り組み(製造株作製用ウイルスの分離) 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
20. Shigeyuki Itamura, Naoko Kono, Sun Lin, Kazuo Ohnishi, Hiroyuki Toh: Systematic analysis of antibody repertoire elicited by influenza vaccine by next generation sequencer (NGS). 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
21. 久保英幸, 改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 高山郁代, 中内美名, 高橋 仁, 影山 努 マイクロ流路チップ-Direct RT-LAMP法を用いた呼吸器病原ウイルス遺伝子検出 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
22. 高橋 仁, 中内美名, 永田志保, 小田切孝人, 影山 努 H7 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製とH7N9 インフルエンザ迅速診断系構築の検討. 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
23. 高山郁代, 仙波晶平, 中内美名, 高橋 仁, 白戸憲也, 米川俊広, 大場邦弘, 松山州徳, 瀬川雄司, 小田切孝人, 影山 努 RT-LAMP法による多項目同時遺伝子検査法を用いたインフルエンザウイルスおよびMERS コロナウイルスを含む呼吸器感染症ウイルスの同定 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
24. Suzuki Y, Odagiri T, Tashiro M, Nobusawa E : Development of a high-growth PR8 master virus for influenza vaccine production in cell culture systems. 第63回日本ウイルス学会学術集会 福岡 2015年11月
25. Kayoko Sato, Manabu Ato, Hideki Asanuma : NF- $\kappa$ B activations by influenza vaccines were mediated through RIG-I, TLR3, and TLR7. 第45回日本免疫学会学術集会 札幌 2015年11月.
26. Ohori J, Asanuma H, Aso K, Ikeda Y, Sugita G, Fujihashi K, McGhee JR, Fujihashi K. Nasal Delivery Of Plasmid Flt3 Ligand And CpG ODN Restore Influenza Virus-Specific Secretory IgA Ab Responses. 第44回日本免疫学会学術集会 札幌 2015年11月
27. 高下恵美 : 日本国内におけるNA阻害薬耐性インフルエンザウイルス検出状況 5th Negative Strand Virus-Japan 沖縄 2016年1月
28. 桑原朋子 : インフルエンザウイルスワクチン株の鶏卵における分離 5th Negative Strand Virus-Japan. 沖縄 2016年1月
29. 渡邊真治 : 2014/15 シーズンのインフルエンザ流行

株と平成 27 年度ワクチン株について 5th Negative

Strand Virus-Japan. 沖縄 2016 年 1 月

30. 影山 努 鳥インフルエンザ 平成 27 年度希少感  
染症診断技術研修会. 東京. 2016 年 2 月